

Warszawa 09.06.2022 r.

Prof. dr hab. n. med. Anna Lutyńska
Zakład Biologii Medycznej
Narodowy Instytut Kardiologii Stefana kardynała Wyszyńskiego-
Państwowy Instytut Badawczy
ul. Alpejska 42
04-628 Warszawa

**Ocena pracy doktorskiej mgr Agnieszki Iwańskiej
pt. „Analiza mechanizmów wirulencji i adaptacji szczepów *Pseudomonas aeruginosa*
u chorych z mukowiscydozą”**

Praca doktorska mgr Agnieszki Iwańskiej została zrealizowana pod kierunkiem promotora głównego – prof. dr hab. n. med. Ewy Augustynowicz-Kopeć i promotora pomocniczego dr n. med. Agnieszki Głogowskiej w Zakładzie Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie.

Praca ma postać bardzo obszernej monografii (220 stron) przygotowany w sposób typowy dla prac doświadczalnych w dziedzinach nauk biologicznych i medycznych. Praca obejmuje wstęp (33 strony), cele pracy, materiały (2 strony), metody (14 stron), wyniki (53 strony), dyskusję (34 strony), wnioski, publikacje doktorantki i prezentację wyników związanych z pracą, streszczenie w j. polskim i j. angielskim, spisy tabel i rycin, piśmiennictwo (221 pozycji) oraz aneksy. W pracy zachowane zostały odpowiednie proporcje między częściami teoretyczną, doświadczalną oraz dyskusją. Piśmiennictwo w większości obejmuje prace z ostatnich 10 lat. Na 221 pozycji piśmiennictwa aż 133 stanowią prace opublikowane w okresie 2018-2022.

Nadrzędnym celem pracy doktorskiej była porównawcza analiza wybranych cech fenotypowych i genotypowych klinicznych szczepów *P. aeruginosa* wyizolowanych od osób przewlekle chorych na mukowiscydozę (CF) w odniesieniu do szczepów wyizolowanych z zakażeń ostrych niezwiązanych z mukowiscydozą (non-CF). Doktorantka wyróżniła cele szczegółowe pracy, tj. określenie specyficznych cech fenotypowych, które umożliwiają *P. aeruginosa* adaptację do dróg oddechowych osób chorych na mukowiscydozę w porównaniu ze szczepami izolowanymi z zakażeń ostrych; analizę czynników wirulencji *P. aeruginosa* w zakażeniach przewlekłych w zależności od wieku osób chorych; określenie zróżnicowania genotypowego i fenotypowego szczepów *P. aeruginosa* izolowanych od chorych na mukowiscydozę w późnych etapach zakażenia przewlekłego oraz analizę zmienności genotypowej szczepów *P. aeruginosa*, w tym celu prześledzenie ich transmisji w populacji chorych.

Założenia wykonanych badań znajdują merytoryczne uzasadnienie w znanej plastyczności genomu *P. aeruginosa* wpływającej na zmienność ekspresji szeregu czynników zjadliwości w zależności m.in. od zróżnicowania samych szczepów stanowiących dawkę zakaźną zdolną do skutecznego wywołania zakażenia, skuteczności działania odpowiedzi układu odpornościowego, wpływu chorób współistniejących oraz presji selekcyjnej indukowanej zastosowaną antybiotykoterapią. Zróżnicowana patogenność szczepów *P. aeruginosa* prowadzi do selekcji cech umożliwiających przystosowanie się drobnoustroju do warunków bytowania w środowisku płuc osób chorych na mukowiscydozę. Ponadto w literaturze fachowej brak jest prac oceniających zmienność fenotypu/genotypu osób CF w porównaniu do non-CF lub badania te wykonano na ograniczonej grupie osób chorych lub w odniesieniu do mniejszej liczby analizowanych cech.

Założenia i cele pracy są interesujące tym bardziej, że pomimo szerokiej wiedzy na temat znaczenia zakażeń *P. aeruginosa* u osób chorych na mukowiscydozę, nadal wiele aspektów pozostaje nie do końca wyjaśnionych, co dotyczy wielu hipotez na temat procesu progresji choroby w odniesieniu do roli statusu gospodarza *versus* czynniki zjadliwości patogenu, roli neutrofili jako czynników efektorowych układu odpornościowego zaangażowanych w rozwój zakażenia u osób chorych na mukowiscydozę, czynników zjadliwości *P. aeruginosa* i mechanizmów adaptacyjnych prowadzących do „ucieczki” przed siłami obronnymi gospodarza oraz zmienności czynników zjadliwości w różnych anatomicznych niszach płuc pacjentów.

Doktorantka we wstępie przedstawiła aktualny stan wiedzy na temat mukowiscydozy, jej podłoża genetycznego, epidemiologii, roli procesu zapalnego w progresji choroby, najczęściej występujących zakażeń wśród osób chorych na mukowiscydozę, charakterystykę: taksonomiczną, czynników zjadliwości oraz genomu *P. aeruginosa* w odniesieniu możliwości terapeutycznych, potencjalnych dróg transmisji, narastającej oporności na antybiotyki oraz dotychczas opisanych mechanizmów adaptacyjnych badanego patogenu do dróg oddechowych osób chorych na mukowiscydozę podczas kolejnych etapów progresji choroby. W rozdziale tym scharakteryzowano dokładnie czynniki zjadliwości *P. aeruginosa* i mechanizmy ich ekspresji ze szczególnym naciskiem na badane w pracy cechy wirulencji stanowiąc jednocześnie uzasadnienie merytoryczne dla podjętego w pracy doktorskiej problemu badawczego.

Nie wnoszę żadnych krytycznych uwag do rozdziałów Materiał i Metody, opracowanych ze szczególną starannością poczynwszy od opisu: metod hodowlanych, identyfikacji oraz biobankowania szczepów, testów oceniających obecność fenotypu śluzowego, badań zdolności wytwarzania plicyjaniny, ruchu, proteazy alkalicznej, elastazy oraz biofilmu, oznaczania wrażliwości na antybiotyki oraz genotypowania ze skrupulatnym opisem procedur izolacji DNA bakteryjnego jako matrycy do badania metodą PFGE, trawienia enzymami restrykcyjnymi oraz warunków rozdziału elektroforetycznego, a także przedstawienia analizy danych klinicznych, kryteriów definicji zakażenia przewlekłego oraz analiz statystycznych.

W tym miejscu prosiłabym doktorantkę o dodatkowe i dokładne przedstawienie zastosowanego systemu biobankowania w kontekście przygotowania serii siewnych macierzystych i roboczych w odniesieniu do przyjętej liczby dopuszczalnych pasażów oraz podanie liczby pasażu, na którym wykonywane były wszystkie badania. Jednocześnie wyjaśnienia wymaga sposób wyznaczenia genetycznego podobieństwa szczepów przyjętych jako identyczne oraz przyjęty zakres wielkości fragmentów restrykcyjnych w kb stanowiących uzyskane profile poddane dalszej analizie klastrowania, co w sposób istotny rzutuje na rozkład dendrogramów.

Badaniom wybranych czynników zjadliwości tj. wytwarzanie plicyjaniny, fenotypu śluzowego, proteazy i elastazy, zdolności do wytwarzania biofilmu oraz ruchu (typów: swimming, swarming i twitching), a także lekooporności doktorantka poddała 549 szczepów *P. aeruginosa* wyizolowanych od 165 osób chorych z potwierdzoną badaniami genetycznymi mukowiscydozą i 90 szczepów wyizolowanych od 90 osób chorych z zakażeniami niezwiązanymi z mukowiscydozą w Instytucie Gruźlicy i Chorób Płuc (IGiChP), Oddziale Terenowym IGiChP w Rabce-Zdroju i Instytucie „Pomnik - Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie w latach 2012-2019. W pracy przedstawiono kliniczną charakterystykę osób chorych, w tym parametrów wydolności układu oddechowego, czasu diagnozy, BMI, wydolności trzustki oraz chorób współtowarzyszących. Wyniki fenotypowe poddano adekwatnej dobranej analizie statystycznej, również w tym w odniesieniu do wieku osób CF: 0-10 lat (8 szczepów), 11-17 lat (46 szczepów) oraz osób dorosłych (495 szczepów wyizolowanych od 48 osób dorosłych przewlekłe chorych) w odniesieniu do grupy pacjentów non-CF. Chciałabym podkreślić, że zastosowany w pracy materiał w postaci szczepów jest wyjątkowo reprezentatywny biorąc pod uwagę liczebność badanych szczepów, stąd przedstawione w dalszej części pracy wnioski, poparte analizą statystyczną, stanowią wiarygodne wyniki badawcze. Uzasadnienie doktorantki co do niewielkiej liczby badanych szczepów wyizolowanych od chorych na mukowiscydozę dzieci jest w pełni uzasadnione, nie mniej jednak na potrzeby publikacji proponuję aby analizę statystyczną uzupełnić o korektę z zastosowaniem odpowiednich współczynników lub tzw. poprawek statystycznych, kiedy porównywane są dane o stosunkowo nierównomiernym rozkładzie liczebności badanych grup.

Częstość występowania szczepów *P. aeruginosa* o fenotypie śluzowym wzrastała po 5 roku życia osiągając poziom ok. 50% w grupie osób chorych powyżej 16 r.ż. Zdolność wytwarzania oraz aktywność plicyjaniny, oceniane jakościowo i ilościowo były ponad dwukrotnie wyższe u szczepów *P. aeruginosa* wyizolowanych od osób chorych z grup: non-CF, dzieci-CF i nastolatki-CF w porównaniu do szczepów wyizolowanych od osób chorych dorosłych-CF. Następnie doktorantka przeprowadziła ocenę aktywności proteolitycznej i elastynolitycznej szczepów *P. aeruginosa*, które bezpośrednio odpowiadają za uszkodzanie komórek nabłonkowych i surfaktantu pęcherzyków płucnych, zaburzenia mechanizmów odpowiedzi

immunologicznej oraz rozluźnienie bariery śródnabłonkowej wpływając na nasilenie rozprzestrzeniania się patogenu organizmie gospodarza w ostrych i wczesnych fazach zakażenia, w tym zmianami odpowiedzi zapalnej w zakażeniach przewlekłych. Najwyższy odsetek szczepów zdolnych do wytwarzania proteazy alkalicznej oraz elastazy doktorantka zaobserwowała w grupie dzieci-CF.

Badania zdolności ruchu pałeczek *P. aeruginosa* za pośrednictwem wici i pili typu IV, które uczestniczą w adhezji komórek, doktorantka przeprowadziła przez pomiar strefy ruchu. Uzyskane wyniki wykazały, że niemal wszystkie szczepy charakteryzowały się zdolnością ruchu typu swimming, przy czym najwyższe jej wartości odnotowano wśród szczepów wyizolowanych od osób chorych non-CF. Doktorantka zaobserwowała zmniejszające się wartości zdolności ruchu typu swarming u szczepów *P. aeruginosa* wyizolowanych kolejno od: dzieci-CF, osób dorosłych non-CF, nastolatków-CF oraz osób dorosłych-CF. Wszystkie szczepy wyizolowane od dzieci-CF wykazywały zdolność ruchu typu swarming, która w pozostałych grupach wahała się w zakresie ok. 61-84%. Najwyższą zdolność ruchu typu twitching stwierdzono wśród szczepów izolowanych od dzieci-CF, przy czym najmniejszą częstość występowania tej cechy stwierdzono wśród szczepów *P. aeruginosa* wyizolowanych od dorosłych-CF (35,6%), która w pozostałych grupach wahała się w zakresie ok. 70-88%.

Doktorantka przeprowadziła cenę zdolności wytwarzania biofilmu przez szczepy *P. aeruginosa*, który pełni funkcje ochronne przed mechanizmami obronnymi gospodarza oraz działaniem środków przeciwdrobnoustrojowych z zastosowaniem metod barwienia fioletem krystalicznym (CV) oraz oceny redukcji bromku 3-(4,5-dimetylo-2-tiazolilo)-2,5difenylo-2H-tetrazoliowego (MTT). Na podstawie uzyskiwanych wartości absorbancji doktorantka sklasyfikowała badane szczepy do czterech kategorii poziomów wytwarzania biofilmu: brak zdolności oraz słabo-, umiarkowanie- oraz silnie- wytwarzające biofilm. Zdolność badanych szczepów *P. aeruginosa* do wytwarzania całkowitej biomasy biofilmu była generalnie różnicowana. Średnie wartości absorbancji oraz częstość występowania szczepów zdolnych do wytwarzania biofilmu *in vitro* wyizolowanych od dzieci-CF i osób dorosłych non-CF były niższe niż w grupach nastolatków-CF i osoby dorosłe-CF. Połowa badanych szczepów wyizolowanych od dzieci-CF silnie wytwarzała biofilm, czyli o ok. 30-26% silniej niż szczepy wyizolowane z pozostałych badanych grup. Najwyższą zdolność aktywności metabolicznej komórek do wytwarzania biofilmu ocenionej z użyciem metody MTT, zależną od liczby żywych komórek oraz szybkości metabolizmu, podobnie jak częstość występowania szczepów silnie wytwarzających biofilm, doktorantka zaobserwowała wśród szczepów *P. aeruginosa* wyizolowanych z zakażeń ostrych (non-CF) i dzieci-CF.

Analiza lekooporności *in vitro* wykazała, że szczepy izolowane od dzieci-CF nie wykazywały oporności na badane antybiotyki, a w pozostałych grupach charakteryzowały się różnicowaną lekoopornością. Szczepy wyizolowane od pacjentów non-CF wykazywały oporność na ciprofloksacynę (48,9%), piperacylinę z tazobaktamem i meropenem (40%), ceftazydym (27,8%) oraz tobramycynę i amikacynę (13,3-18,9%). Najwyższą lekooporność odnotowano wśród szczepów *P. aeruginosa* wyizolowanych z zakażeń ostrych (non-CF) i osób dorosłych-CF, co doktorantka powiązała ze specyfiką oddziało, z których pochodziły szczepy (oddział intensywnej terapii), długotrwałą hospitalizacją chorych lub przewlekłe prowadzoną antybiotykoterapią. W grupie nastolatków-CF najwyższe odsetki szczepów opornych zaobserwowano w przypadkach amikacyny (45,7%) i tobramycyny (28,3%). Oporność na piperacylinę z tazobaktamem oraz meropenem wyniosła odpowiednio 8,7% oraz 26,1%. Niespełna 15% szczepów wykazywało oporność na ciprofloksacynę. W grupie osób dorosłych-CF doktorantka zaobserwowała najwyższe odsetki szczepów *P. aeruginosa* opornych na ciprofloksacynę (49,1%), amikacynę (48,5%) i tobramycynę (29,5%), piperacylinę z tazobaktamem (22,6%) oraz ceftazydym (31,1%). Jedynie 2,8% szczepów wykazywało oporność na kolistynę.

Statystyczna analiza otrzymanych wyników analizy fenotypowej *P. aeruginosa* w grupie non-CF i CF zastosowaniem testu U Manna-Whitneya wykazała, że aktywność i częstość występowania wszystkich czynników wirulencji z wyjątkiem elastazy była istotnie niższa w grupie szczepów *P. aeruginosa* izolowanych z zakażeń przewlekłych (dorośli, nastolatki, dzieci) niż z zakażeń ostrych non-CF. Natomiast w grupie osób chorych-CF istotnie częściej niż w grupie non-CF występował fenotyp śluzowy. Z kolei porównanie aktywności czynników zjadliwości w grupach wieku osób chorych-CF przewlekłe zakażonych *P.*

aeruginosa wykazało, że aktywność elastazy i poziom wytwarzania biofilmu były istotnie wyższe u dzieci-CF niż u nastolatków-CF i osób dorosłych-CF. Aktywność proteazy, zdolność ruchu typu swarming i wytwarzanie piocyjaniny były istotnie niższe u osób dorosłych-CF niż u dzieci-CF i nastolatków-CF. Zdolność ruchu typu twitching była istotnie niższa u osób dorosłych-CF niż nastolatków-CF. Nie wykazano istotnej różnicy w aktywności ruchu typu swimming wśród szczepów przyporządkowanych do badanych grup pacjentów. Odsetek szczepów zdolnych do produkcji proteazy, piocyjaniny, ruchu typu swimming, swarming, twitching oraz zdolnych do wytwarzania biofilmu oceniany metodą MTT obniżał się w sposób statystycznie istotny wraz z wiekiem chorych na mukowiscydozę. Tego rodzaju zależność nie była statystycznie znamienna w przypadku elastazy oraz zdolności wytwarzania biofilmu ocenianej metodą CV. Występowanie szczepów *P. aeruginosa* o fenotypie śluzowym istotnie wzrastało z wiekiem osób chorych na mukowiscydozę. Doktorantka podsumowując badania fenotypowe podkreśliła wysoką aktywność wybranych czynników zjadliwości wśród szczepów przyporządkowanych do grupy non-CF oraz na wczesnych etapach zakażenia, tj. u dzieci-CF i nastolatków-CF, wzrost częstości występowania fenotypu śluzowego *P. aeruginosa* w późnych etapach zakażenia u chorych-CF przy braku istotnych statystycznie różnic w aktywności elastazy.

Przedstawione wyniki stanowią istotny wkład w zrozumienie procesów patogenezy *P. aeruginosa* u osób chorych na mukowiscydozę i potwierdzają, że rozwój zakażenia podczas kolejnych etapów progresji choroby wraz z wiekiem pacjentów jest bezpośrednio powiązany ze zmianami w ekspresji czynników zjadliwości, co zapewne wpływa również na deregulację układu immunologicznego, a z pewnością na rozwój lekooporności, a tym samym na skuteczność zastosowanej terapii. Te wyniki są istotnie powiązane z dwoma podstawowymi problemami w tym zagadnieniu: lekoopornością i zakażeniami przewlekłymi *P. aeruginosa*, co należy wiązać z tworzeniem biofilmu już na wstępnym etapie zakażenia – jak wskazują wyniki doktorantki, co powoduje narastanie oporności na stosowaną terapię oraz czynniki efektorowe wrodzonej i nabytej odporności. Jak wskazują dane z piśmiennictwa w/w oporność może być nawet 1000 razy większa niż w przypadku „planktonicznych” bakterii. Wyniki doktorantki potwierdzają zatem obserwacje badaczy wskazujące, że *P. aeruginosa* jest dominującym patogenem u osób dorosłych z mukowiscydozą jako, że ponad $\frac{3}{4}$ chorych jest zakażonych tym patogenem. Wyniki uzyskane przez doktorantkę potwierdzają także hipotezę, że stosowana terapia jest obciążona wysokim ryzykiem niepowodzenia. Zrozumienie dynamiki patogenezy *P. aeruginosa* u chorych na mukowiscydozę jest zatem uzależnione od poznania adaptacyjnych procesów, które jak udowodniła doktorantka stanowią samo sedno mechanizmu unikania tego patogenu przed działaniem terapii antybiotykowej i ustabilizowaniu się tzw. zakażeń przewlekłych. Zmiany adaptacyjne fenotypu wynikające z licznych mutacji adaptacyjnych wpływać mogą na zróżnicowanie fenotypu i genotypu populacji bakterii tworzących unikatową barierę biofilmu odmienną u każdej osoby chorej. Idąc zapewne tym tropem doktorantka poszła o krok dalej, przeprowadzając bardzo interesujące badania genetycznej zmienności *P. aeruginosa*.

W pracy do oceny genetycznej zmienności 120 szczepów *P. aeruginosa* wyizolowanych w różnym czasie od 10 osób przewlekle chorych na mukowiscydozę zastosowano metodę PFGE, a otrzymane wyniki skorelowano z wynikami analiz fenotypowych. Wybrana grupa osób chorych, scharakteryzowana klinicznie, z genetycznie potwierdzoną mutacją F508del, została adekwatnie dobrana pod względem wysokiej częstości wizyt ambulatoryjnych, hospitalizacji oraz zaostrzeń choroby. Wśród analizowanych szczepów zidentyfikowano 28 różnych profili PFGE, których większość stanowiła genotypy unikatowe oraz 10,7% profili przyporządkowano do klastrow o istotnym genetycznym podobieństwie: IG1, IG2, IG3 i określonych w pracy jako „transmisyjne”. Doktorantka założyła, że genetyczne identyczne szczepy/klastery mogą wytwarzać czynniki zjadliwości zapewniające im przewagę selekcyjną, umożliwiającą skuteczniejszą transmisję w porównaniu ze szczepami o unikatowych profilach restrykcyjnych DNA. Dlatego doktorantka podjęła próbę wyznaczenia wspólnego markera fenotypowego. Zdolność ruchu typu twitching i wytwarzania piocyjaniny były istotnie wyższe wśród szczepów „transmisyjnych”, czego nie zaobserwowano w przypadku aktywności proteazy i elastazy, zdolności ruchu typu swarming, wytwarzania biofilmu oraz fenotypu lekooporności. Szczepy wytwarzające proteazę, elastazę, piocyjaninę i wykazujące ruch typu twitching występowały w szczepach „transmisyjnych” istotnie częściej niż w szczepach nietransmisyjnych.

Analiza czynników zjadliwości szczepów należących do klastrow IG1, IG2 i IG3 wykazała wysoką niejednorodność fenotypową. Szczepy zaliczone do klastrow IG1 i IG3 cechowała wyższa w porównaniu do IG2 aktywność ruchu typu swimming i swarming, produkcji piocyjaniny i aktywności elastazy. Z kolei szczepy klastra IG2 cechowały się wyższą opornością na badane antybiotyki, zdolnością ruchu typu swimming i swarming, wytwarzaniem piocyjaniny i aktywnością elastazy. Przeciwnie, szczepy klastra IG2 cechowała wyższa oporność na badane antybiotyki w porównaniu ze szczepami klastrow IG1 i IG3. Wśród szczepów „transmisyjnych” wykazano wyższy odsetek szczepów wytwarzających proteazę alkaliczną, elastazę, piocyjaninę i wykazujących zdolność ruchu typu twitching w porównaniu ze szczepami „nietransmisyjnymi”. Częstość występowania fenotypu śluzowego szczepów klastrow IG1, IG2 i IG3 kształtowała się na poziomie, odpowiednio ok. 44%, 22% i 50%. Otrzymane wyniki zdaniem doktorantki słusznie wskazują, że potencjalna transmisja między osobami chorymi mogła wynikać z ekspresji określonego panelu czynników wirulencji *P. aeruginosa*, przy czym skuteczna kolonizacja określonymi szczepami należącymi do określonych klastrow również mogła wynikać z określonego stanu i statusu klinicznego osób chorych. Nie można jednak wykluczyć, że inne cechy wirulencji sprzyjały swoistej adaptacji prowadzącej do transmisji krzyżowej.

Otrzymane wyniki potwierdzają wyniki badań wskazujące, że *P. aeruginosa* jest patogenem o bardzo wysokim potencjale adaptacyjnym do zmieniających się warunków bytowania, co zapewne wynika m.in. z wielkości genomu (6,3 Mbp, 4279 genów) w porównaniu do innych bakterii, który koduje m.in. szereg różnych regulatorów transkrypcji lub systemów regulacyjnych. *P. aeruginosa* posiada 486 genów regulatorowych (8,4% genomu) w porównaniu do np. *E. coli* (5,8%), *M. tuberculosis* (3%) czy *H. pylori* (1,1%), co w odniesieniu do wyników otrzymanych przez doktorantkę, świadczy o niezwyklej możliwościach dodatkowej genetycznej pojemności i wyjaśnia także wysoko adaptacyjną naturę tego patogenu, w szczególności w odniesieniu do antybiotyków i czynników stresowych w środowisku bytowania.

Szczególnie ważne i interesujące wyniki badań doktorantki dotyczyły oceny względnej liczby zidentyfikowanych genotypów u każdej badanej osoby chorej w całym okresie leczenia. Wyniki typowania PFGE wykazały, że szczepy izolowane od pojedynczych osób chorych generalnie charakteryzowały się stabilnością profili restrykcyjnych co może wskazywać na znamiona trwałej adaptacji do dróg oddechowych lub niezależną ponowną kolonizację z identycznego źródła zakażenia. Z kolei, występowanie różnych profili restrykcyjnych wśród szczepów wyizolowanych od pojedynczej osoby chorej w całym okresie leczenia mogło zostać powiązane z czasowym utrzymywaniem się określonych genotypów szczepów oraz wymianą jednych genotypów na inne, prawdopodobnie lepiej przystosowane do utrzymywania się w drogach oddechowych chorych (np. po skutecznym leczeniu). Doktorantka także powinna wziąć pod uwagę możliwość, że zakażenie mogło zostać pierwotnie wywołane przez mieszaninę szczepów (izolatów), przy czym zasada uzyskiwania zawiesiny z pojedynczej kolonii mogła być przyczyną przeoczenia heterogenności całej mieszaniny heterogennych izolatów pochodzących z różnych kolonii uzyskanych w wyniku posiewu materiału klinicznego. W takim przypadku mogło dochodzić do błędnego odczytu na skutek otrzymania wyniku tylko pojedynczego genotypu.

Analiza porównawcza szczepów wyizolowanych od osób chorych w trakcie przewlekłego zakażenia charakteryzujących się genotypową stabilnością lub zmiennością wykazała różnice w częstości i długości hospitalizacji oraz cykli terapii dożylnych. O ile doktorantka słusznie wnioskuje, że chorzy z zaawansowaną chorobą płuc częściej hospitalizowani są bardziej narażeni na nabywanie szczepów ze środowiska lub od innych chorych, to wniosek o potencjalnym wpływie genotypowego zróżnicowania szczepów jako czynnika zaostrzeń choroby jest w mojej ocenie zbyt daleko idący. Tym bardziej, że ocena zróżnicowania fenotypowego wszystkich badanych szczepów o najwyższej i najniższej genetycznej zmienności wzorów PFGE wyizolowanych odpowiednio od dwóch osób chorych w latach odpowiednio 2012-2019 oraz 2013-2019 nie potwierdziła jednorodności fenotypowej. Zmienność badanych czynników zjadliwości dotyczyła zarówno koegzystencji fenotypów uważanych za markery przewlekłej adaptacji (fenotyp śluzowy, utrata ruchu) i cech powiązanych z zakażeniami ostrymi (proteaza, piocyjanina, zdolność ruchu), a także profili wrażliwości na antybiotyki. Interesujące wyniki doktorantka otrzymała podczas badań czynników wirulencji

120 szczepów wyizolowanych od osób chorych w okresie zaostrzeń i stabilności klinicznej. Szczepy wyizolowane od osób chorych w okresach zaostrzeń choroby znamienne częściej charakteryzowały się fenotypem śluzowym i zdolnością ruchu typu swimming. Na podstawie uzyskanych wyników, podobnie nie można wnioskować, że zaostrzenia w chorobie oskrzelowo-płucnej u chorych na mukowiscydozę były powiązane z wyższą wirulencją szczepów *P. aeruginosa*.

Chciałabym podkreślić, że wszystkie otrzymane wyniki przez doktorantkę stanowią cenne źródło merytorycznej wiedzy o istotnym nacechowaniu aplikacyjnym i rozwojowym. W podsumowaniu potwierdzam, że rozdział „Wyniki” są bardzo dobrze udokumentowane, przejrzyste przedstawione, co nie było łatwym zadaniem ze względu na obszerność danych. Doktorantka w swojej pracy wykazała się ogromną znajomością i biegłością przeprowadzania badań mikrobiologicznych, biochemicznych oraz molekularnych, a przedstawione wyniki w mojej ocenie są w pełni wiarygodne, a wnioski końcowe uprawnione. Dyskusja stanowi w ocenianej pracy obszerny i bogaty merytorycznie rozdział, który sam w sobie może stanowić artykuł przeglądowy. Doktorantka celnie przytacza piśmiennictwo, wskazuje ich wady i zalety, dyskutuje z postawionymi przez innych badaczy hipotezami i konfrontuje z zastosowanymi metodami i uzyskanymi wynikami. Uzyskane wyniki przez doktorantkę w mojej ocenie są kluczowe w kontekście potrzeby opracowania dalszych wytycznych konwencjonalnej mikrobiologii zakażeń *P. aeruginosa* u osób chorych z mukowiscydozą, szczególnie w zakresie oznaczania wrażliwości na antybiotyki. Paul Ewald w swojej książce „Evolution of the Disease”, przewidywał stosunkowo dawno temu, że w przypadku pewnych gatunków bakterii, pojedyncza kolonia stanowiąca „izolat” często rzutuje o naszej wiedzy o fenotypie lub genotypie danej bakterii, natomiast heterogenność wszystkich komórek bakterii stanowiących w hodowli pojedyncze kolonie może być większa niż przypuszczamy.

Wobec wyżej przedstawionej pozytywnej oceny pracy doktorskiej mgr Agnieszki Iwańskiej i uznania wartości poznawczej i aplikacyjnej uzyskanych wyników stwierdzam, że oceniana praca doktorska spełnia wymogi art. 12 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki oraz art. 179 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. przepisy wprowadzające ustawę Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce, stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień doktora w dyscyplinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu. Z uznaniem wnoszę więc do Rady Naukowej Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc o dopuszczenie mgr Agnieszki Iwańskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie uważam, że praca doktorska mgr Agnieszki Iwańskiej zasługuje na stosowne wyróżnienie ze względu na ambitne cele w odniesieniu do tak ważnego zagadnienia, obszerność wykonanej pracy oraz istotne merytorycznie uzyskane wyniki. Z postawieniem formalnego wniosku wstrzymam się do czasu udzielenia mi odpowiedzi przez mgr Agnieszkę Iwańską na zawarte w ocenie pytania i sugestie.

Kierownik
Zakładu Biologii Medycznej
Tel. 22 638 10 63
Prof. dr hab. n. med. Anna Lutyńska

08.06.2022